



Penggunaan Protease dari Getah Biduri dalam Produksi Flavor Udang Windu (*Penaeus monodon*)

[Utilization of Protease from Biduri Sap for Production Windu Shrimp Flavor (*Penaeus monodon*)]

Jaya Hardi¹ dan Diharnaini²

¹Staf Pengajar Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Tadulako,

²Staf Laboran Jurusan Kimia Fakultas Universitas Tadulako

ABSTRACT

Shrimp flavor including one of the high-value product that can be produced from the sap biduri protease activity. This research intends to know the concentration of biduri protease isolated and reaction times that result high-quality shrimp flavor. Achievement of objectives has been applied randomized block design with factorial treatment pattern that consists of two factors, namely the biduri protease concentration factor with three levels and hydrolysis time factor with three levels. Observed parameters include water content, soluble protein content and organoleptic quality of shrimp flavor. The results obtained indicate the concentration of biduri protease having an affect on the water content, soluble protein content and organoleptic quality, while the hydrolysis time having an affect only on the soluble protein content and organoleptic quality. The highest soluble protein content (71.65%) and the lowest water content (11.08%) was found in the combination of biduri protease concentration of 2.5% for 2 hours hydrolysis.

Key words: *Shrimp flavor, biduri protease concentration, hydrolysis time, soluble protein*

ABSTRAK

Flavor udang termasuk salah satu produk bernilai ekonomi tinggi yang dapat dihasilkan dari aktivitas protease getah biduri. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi protease biduri hasil isolasi dan waktu reaksi yang menghasilkan cita rasa udang bermutu tinggi. Pencapaian tujuan telah diterapkan Rancangan Acak Kelompok pola perlakuan faktorial yang terdiri dari dua faktor, yaitu faktor konsentrasi protease biduri dengan tiga taraf dan faktor waktu hidrolisis dengan tiga taraf. Parameter yang diamati mencakup kadar air, kadar protein terlarut dan mutu organoleptik flavor udang. Hasil yang diperoleh menunjukkan konsentrasi protease biduri berpengaruh terhadap kadar air, kadar protein terlarut dan mutu organoleptik, sedangkan waktu hidrolisis hanya berpengaruh terhadap kadar protein terlarut dan mutu organoleptik. Kadar protein terlarut tertinggi (71,65%) dan kadar air terendah (11,08%) didapatkan pada kombinasi konsentrasi protease biduri 2,5 % selama 2 jam hidrolisis.

Kata kunci: *Flavor udang, konsentrasi protease biduri, waktu hidrolisis, protein terlarut*

I. LATAR BELAKANG

Protease merupakan jenis enzim penghidrolisis protein yang memiliki nilai ekonomis tinggi karena aplikasinya yang luas (Akhdiya, 2003). Salah satu aplikasi protease adalah pada industri pangan, seperti pengempuk daging (Murtini dan Qomaruddin, 2003), hidrolisat protein (Subagio dkk, 2002), pembuatan keju, dan sebagainya. Produksi protease dapat diperoleh dari makhluk hidup, meliputi mikroorganisme, hewan, dan tanaman (Witono, 2007c). Namun demikian, untuk memproduksi enzim protease dari beberapa sumber tersebut masih menghadapi banyak kendala, sehingga protease yang dihasilkan masih sangat terbatas. Di lain pihak, setiap tahunnya kebutuhan enzim protease bagi industri pangan cenderung meningkat (Witono, 2008).

Mikroba yang banyak digunakan untuk memenuhi kebutuhan enzim protease belum mampu memenuhi kebutuhan industri pangan, khususnya di Indonesia, sehingga enzim protease lebih banyak diimpor dengan harga yang relatif mahal (Witono, 2007c). Oleh karena itu, perlu dicari sumber protease alternatif pengganti mikroba.

Tanaman dapat dijadikan salah satu alternatif penghasil enzim protease. Salah satu tanaman yang memiliki potensi untuk

dieksplorasi secara optimal sebagai sumber enzim protease adalah Tanaman Biduri (*Calotropis gigantea*). Biduri yang hidup di lahan kering dan tepi jalan termasuk jenis tumbuhan semak liar tropis yang kurang dimanfaatkan. Salah satu bagian tanaman biduri dapat dimanfaatkan sebagai sumber protease adalah getahnya (Witono, 2007b). Indonesia merupakan wilayah yang memiliki populasi tanaman biduri yang cukup melimpah seperti di daerah Pulau Jawa dan Sulawesi termasuk Sulawesi Tengah.

Kota Palu termasuk salah satu daerah dengan populasi tanaman biduri yang melimpah di Sulawesi Tengah. Tanaman tersebut belum dimanfaatkan oleh masyarakat setempat bahkan dianggap gulma. Keadaan tersebut memberi indikasi bahwa tanaman biduri dapat berperan sebagai sumber pendapatan masyarakat kota Palu dalam pemanfaatannya sebagai penghasil enzim protease yang memiliki manfaat besar. Berdasarkan indikasi tersebut, perlu dilakukan penelitian tentang pemanfaatan protease biduri sebagai biokatalis yang menghasilkan produk bernilai ekonomi tinggi.

Flavor (cita rasa) udang termasuk salah satu produk bernilai ekonomi tinggi yang mungkin dapat dihasilkan dari aktivitas protease biduri. Produk *flavor*

udang yang terbentuk diharapkan mampu menggantikan peranan penyedap rasa mononatrium glutamat (MSG) yang dapat menghasilkan efek samping bagi kesehatan manusia apabila terjadi akumulasi secara terus menerus (Ardyanto, 2004). Dengan melakukan hidrolisis tepung udang pada konsentrasi protease dan waktu hidrolisis tertentu, diharapkan akan dihasilkan hidrolisat protein yang bercita rasa udang.

II. BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Bahan utama yang digunakan adalah udang windu kecil dan getah tanaman biduri. Bahan pendukung yang digunakan berupa amonium sulfat 65%, buffer fosfat pH 7 dan CMC (*Carboxy Methyl Cellulose*), gula, garam, dan air destilata.

Peralatan yang digunakan meliputi: neraca analitik, lemari pendingin, oven vakum (*Civilab Australia*), penangas air (*Schutzart 40500 – Ip 20*), blender (*stainless steel*), pemanas listrik (*hot plate*), pengaduk magnetik, spektrofotometer visibel (*UNICO 1100 RS*), ayakan 80 mesh, baskom plastik, dan alat-alat gelas.

Rancangan Penelitian

Penelitian ini dirancang menggunakan rancangan acak kelompok pola faktorial (RAKF) dengan dua faktor. Faktor

pertama (A) adalah konsentrasi isolat protease biduri dengan 3 taraf masing-masing 1,5% (w/w) (A1); 2% (w/w) (A2); dan 2,5% (w/w) (A3). Faktor kedua (B) waktu hidrolisis yang terdiri atas 3 taraf masing-masing 0 jam (B1); 1 jam (B2); dan 2 jam (B3).

Pembuatan Tepung Udang Windu

Udang windu sebanyak 2 kg dibersihkan dan dipisahkan kepala dan kulitnya. Kemudian dijemur di bawah sinar matahari dan diblender untuk memperoleh tepung udang dalam keadaan kering.

Isolasi Protease Getah Biduri

Isolasi protease dilakukan menggunakan modifikasi metode Witono (2007b). Getah biduri yang terkumpul diukur volumenya dan ditepatkan satu liter dengan air destilata. Larutan getah biduri dimasukkan ke dalam gelas kimia, kemudian ditambah amonium sulfat sebanyak 650 gram (tingkat kejenuhan 65%). Campuran selanjutnya didinginkan di dalam lemari pendingin selama 24 jam. Bagian yang menggumpal yang terletak di permukaan, dipisahkan dan disaring dengan kertas saring berlipat. Endapan yang dihasilkan selanjutnya dikeringkan di dalam oven vakum suhu 50°C hingga kering, kemudian protease kering ditimbang untuk mengetahui rendemennya.

Penggunaan Protease dari Getah Biduri dalam Produksi Flavor Udang Windu (Jaya Hardi dan Diharnaini)

Hidrolisis Protein Udang dengan Isolat Protease Getah Biduri

Pelaksanaan hidrolisis menggunakan modifikasi metode Witono (2007d). Tepung udang dengan jumlah tertentu dicampurkan larutan buffer fosfat pH 7 dengan rasio bahan 1: 8 (w/v). Suspensi tepung udang yang dihasilkan selanjutnya ditambahkan enzim protease pada konsentrasi tertentu (sesuai perlakuan). Campuran selanjutnya dipanaskan di dalam penangas air suhu 55°C dengan waktu tertentu (sesuai perlakuan), setelah itu dididihkan selama 10 menit. Campuran sebagai hidrolisat protein selanjutnya ditambah 1% CMC; 2% gula; dan 2% garam atas dasar berat udang sambil diaduk sampai mengental. Kemudian dihamparkan dalam loyang dan dikeringkan dalam oven analitik suhu 45°C. Setelah kering diblender dan diayak 80 mesh. Hasil ayakan sebagai flavor udang dianalisis kadar air, kadar protein terlarut, kadar protein total, dan mutu organoleptik meliputi warna, aroma, rasa, dan kesukaan.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

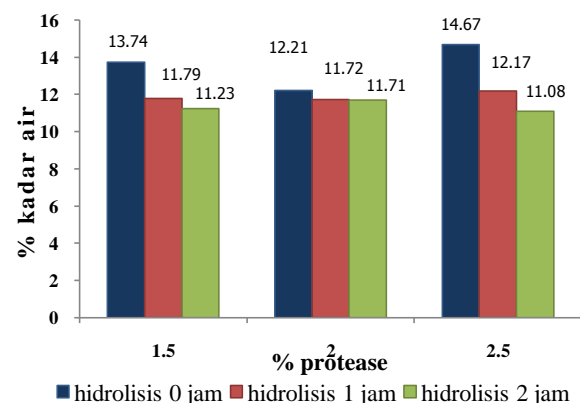
Kadar Air Flavor Udang

Daya awet suatu bahan pangan sangat ditentukan oleh kandungan air bahan pangan tersebut. Bahan pangan dinyatakan awet dalam arti tidak rusak oleh mikroorganisme, jika kadar air bahan

Penggunaan Protease dari Getah Biduri dalam Produksi Flavor Udang Windu
(Jaya Hardi dan Diharnaini)

pangan tidak lebih dari 12% (Mappiratu, 2007).

Hasil analisis kadar air yang diperoleh (Gambar 1) menunjukkan kadar air flavor udang tertinggi (14,67%) terdapat pada penggunaan 2,5% protease biduri dengan waktu hidrolisis 0 jam, sedangkan kadar air terendah (11,08%) ditemukan pada penggunaan 2,5% protease biduri dengan waktu hidrolisis 2 jam.



Gambar 1. Histogram Kadar air flavor udang pada berbagai konsentrasi protease dan waktu hidrolisis.

Pada Gambar 1 memperlihatkan kadar air flavor udang menurun dengan meningkatnya waktu hidrolisis untuk semua konsentrasi protease biduri yang diterapkan. Hasil analisis ragam menunjukkan terdapat interaksi antara konsentrasi protease dengan waktu hidrolisis terhadap kadar air flavor udang. Konsentrasi protease biduri berpengaruh sangat nyata terhadap kadar air flavor udang, sedangkan waktu hidrolisis tidak berpengaruh. Dengan demikian tidak

terdapat perbedaan kadar air yang berarti pada waktu hidrolisis yang berbeda.

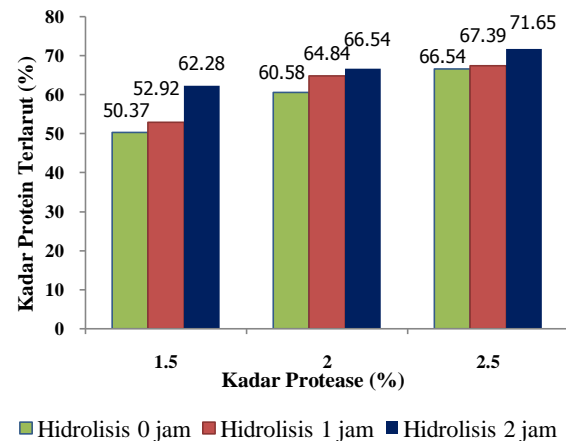
Dengan mengacu pada kadar air yang aman terhadap kerusakan mikrobiologi, maka flavor udang yang dihasilkan dari penggunaan konsentrasi protease biduri 1,5; 2 dan 2,5% dengan waktu hidrolisis 0 jam belum masuk dalam kategori aman dari kerusakan, sebab kadar airnya lebih tinggi dari 12%. Demikian pula yang dihasilkan dari penggunaan konsentrasi protease biduri 2,5% dengan waktu hidrolisis 1 jam. Faktor yang menyebabkan hal tersebut diduga oleh waktu pengeringan yang sangat terbatas.

Witono (2007d) melaporkan kadar air flavor kedelai mengalami penurunan pada peningkatan waktu hidrolisis, demikian pula kadar air flavor kedelai menurun dengan meningkatnya konsentrasi protease biduri. Sebagaimana yang dikemukakan Whittaker (1994 dalam Witono,dkk., 2007d) bahwa selain menurunkan berat molekul polipeptida, hidrolisis protein juga menyebabkan kerusakan dari struktur globular protein, sehingga kemampuan mengikat air menjadi berkurang.

Kadar Protein Terlarut Flavor Udang

Protein terlarut timbul akibat adanya kerja enzim protease, dimana protein tidak larut dihidrolisis menjadi protein terlarut. Fenomena tersebut memberikan indikasi peningkatan jumlah protease akan

meningkatkan jumlah protein terlarut. Demikian pula waktu hidrolisis, semakin lama waktu hidrolisis, semakin banyak protein terlarut.



Gambar 2. Histogram Kadar protein terlarut flavor udang pada berbagai konsentrasi protease dan waktu hidrolisis.

Hasil yang diperoleh (Gambar 2) menunjukkan bahwa kadar protein terlarut tertinggi (71,65%) terdapat pada penggunaan 2,5% protease biduri dengan waktu hidrolisis 2 jam, sedangkan kadar protein terlarut terendah (50,37%) ditemukan pada penggunaan 1,5% protease biduri dengan waktu hidrolisis 0 jam. Dengan mengacu pada kadar protein total udang (71,7%), maka kadar protein yang tidak terlarut tertinggi (21,33%) berada pada penggunaan 1,5% protease biduri dengan waktu hidrolisis 0 jam, sedangkan kadar protein yang tidak terlarut terendah (0,05%) berada pada penggunaan 2,5% protease biduri dengan waktu hidrolisis 2 jam.

Pada Gambar 2 memperlihatkan kadar protein terlarut flavor udang meningkat dengan meningkatnya konsentrasi protease biduri dan waktu hidrolisis. Hasil ini sesuai dengan yang dilaporkan Subagio, dkk. (2002) bahwa kadar protein terlarut hidrolisat protein tempe meningkat seiring dengan waktu hidrolisis yang semakin lama. Hasil analisis ragam menunjukkan terdapat interaksi antara konsentrasi protease biduri dengan waktu hidrolisis terhadap kadar protein terlarut flavor udang. Konsentrasi protease biduri berpengaruh nyata terhadap kadar protein terlarut flavor udang, sedangkan waktu hidrolisis berpengaruh sangat nyata.

Protein terlarut pada penggunaan 2,5% protease biduri dengan waktu hidrolisis 2 jam adalah kombinasi terbaik dengan kadar protein terlarut yang hampir mendekati kadar protein total udang, yaitu dengan kadar protein tak terlarut terendah (0,05%). Hasil tersebut menunjukkan bahwa hidrolisat protein udang lebih banyak membentuk peptida-peptida rantai pendek dan asam amino bentuk *L* yang merupakan sumber pembentuk cita rasa.

Secara mekanisme, enzim protease biduri memecah polipeptida protein menjadi peptida-peptida dan asam amino sederhana yang mudah larut. Begitu pula waktu hidrolisis yang lama mengakibatkan

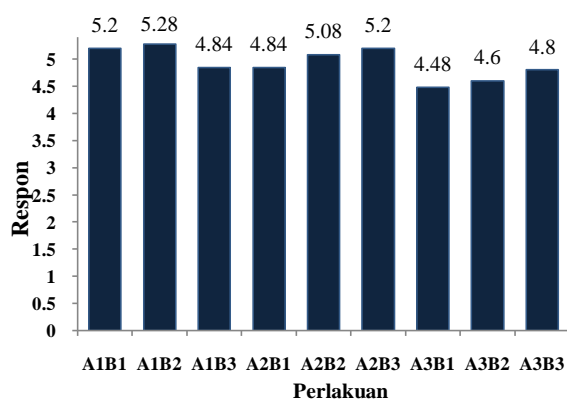
interaksi antara substrat dengan enzim semakin lama sehingga semakin meningkatkan jumlah protein sederhana yang sangat mudah untuk larut. Sebagaimana yang dilaporkan oleh Witono, dkk. (2007d) bahwa konsentrasi protease biduri yang semakin tinggi dan waktu hidrolisis yang semakin lama, akan menyebabkan kadar protein terlarut flavor kedelai semakin tinggi. Peristiwa tersebut terjadi karena enzim protease akan memecah protein menjadi peptide-peptida sederhana dan asam-asam amino yang mudah larut.

Mutu Organoleptik Flavor Udang

Proses hidrolisis protein udang akan mengubah citarasa karena terbentuknya peptida-peptida rantai pendek dan asam amino, yang berperan dalam pembentukan sifat gurih pada flavor udang yang dihasilkan. Rasa gurih dari hidrolisat protein lebih dikenal dengan istilah *umami* (McCabe dan Rolls, 2007). Untuk mengetahui tingkat kesukaan terhadap flavor udang, baik rasa, aroma maupun bau, maka dilakukan uji mutu hedonik pada 25 panelis dengan kisaran respon 1 – 7 untuk masing-masing atribut. Misalkan uji kesukaan, nilai 1 = sangat tidak suka, 2 = tidak suka, 3 = agak tidak suka, 4 = netral, 5 = agak suka, 6 = suka, 7 = sangat suka.

a. Rasa Gurih Flavor Udang

Rasa gurih merupakan sifat yang paling mendukung dalam pembentukan flavor. Hasil yang diperoleh (Gambar 3) menunjukkan tingkat kesukaan rasa gurih flavor udang tertinggi adalah pada penggunaan 1,5% protease biduri dengan waktu hidrolisis 1 jam sebesar 5,38 (agak gurih). Sedangkan tingkat kesukaan rasa gurih flavor udang terendah adalah pada penggunaan 2,5% protease biduri dengan waktu hidrolisis 0 jam sebesar 4,48 (cenderung netral).



Gambar 3. Histogram uji mutu hedonik untuk sifat gurih flavor udang

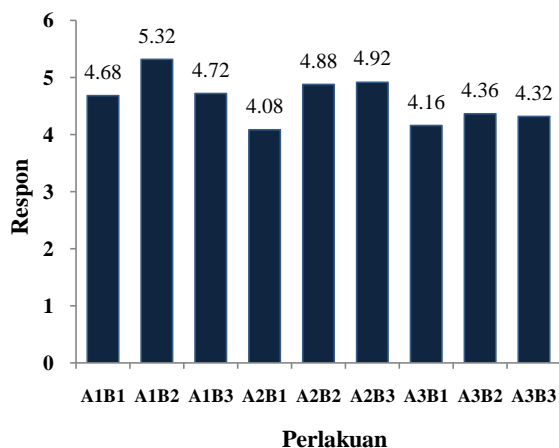
Pada Gambar 3 memperlihatkan bahwa tingkat kesukaan rasa gurih hanya berkisar pada rasa netral sampai dengan agak gurih. Hasil analisis ragam menunjukkan tidak terdapat interaksi antara konsentrasi protease biduri dengan waktu hidrolisis terhadap rasa gurih flavor udang. Konsentrasi protease biduri berpengaruh tidak nyata pada perubahan rasa gurih dari flavor udang, begitu pula

pada waktu hidrolisis. Dengan demikian tidak terdapat perbedaan rasa gurih flavor udang yang berarti pada berbagai konsentrasi protease biduri dan waktu hidrolisis.

Rasa gurih yang dihasilkan pada flavor udang cenderung menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi protease yang dihasilkan maka semakin kurang gurih. Hal ini terjadi karena jumlah protease yang berlebihan akan mengakibatkan hidrolisis yang berlebihan pula sehingga akan menimbulkan rasa pahit pada flavor udang. Nielsen (1997 dalam Witono 2007) mengemukakan bahwa rasa pahit pada hidrolisat protein muncul apabila gugus hidrofobik dari peptida telah terekspos.

b. Aroma Flavor Udang

Tingkat aroma yang ditimbulkan sangat tergantung dari proses hidrolisis, dimana aroma yang dihasilkan sangat khas aroma udang. Hasil yang diperoleh (Gambar 4) menunjukkan tingkat kesukaan aroma flavor udang tertinggi adalah pada penggunaan 1,5% protease biduri dengan waktu hidrolisis 1 jam sebesar 5,32 (agak harum). Sedangkan tingkat kesukaan aroma flavor udang terendah adalah pada penggunaan 2 % protease biduri dengan waktu hidrolisis 0 jam sebesar 4,08 (netral).



Gambar 4. Histogram uji mutu hedonik untuk sifat harum flavor udang

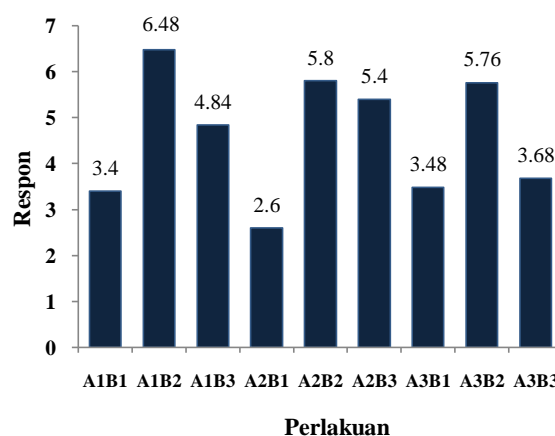
Pada Gambar 4 memperlihatkan bahwa tingkat kesukaan aroma flavor udang hanya berkisar pada aroma netral sampai dengan agak harum. Hasil analisis ragam menunjukkan terdapat interaksi antara konsentrasi protease biduri dengan waktu hidrolisis terhadap aroma flavor udang. Konsentrasi protease biduri berpengaruh nyata pada perubahan aroma flavor udang, begitupula pada waktu hidrolisis.

Pada dasarnya tingkat keharuman yang terlihat cenderung menunjukkan semakin lama hidrolisis, maka semakin tinggi tingkat keharuman. Aroma sebenarnya dihasilkan dari gula yang ditambahkan, asam amino bebas, peptida-peptida, nukleotida dan asam-asam organik yang berperan sebagai prekursor utama dalam pembentukan flavor gurih pada hidrolisat yang dihasilkan. Sehingga semakin lama dihidrolisis, maka semakin

banyak pula senyawa-senyawa prekursor aroma harum yang terbentuk. Namun, pada penambahan konsentrasi protease biduri tidak memperlihatkan pola yang jelas akan tingkat keharuman flavor yang dihasilkan.

c. Warna Flavor Udang

Warna flavor udang yang ditimbulkan sangat tergantung dari proses hidrolisis, dimana warna yang dihasilkan adalah warna merah khas pada udang.



Gambar 5. Histogram uji mutu hedonik untuk sifat warna flavor udang.

Hasil yang diperoleh (Gambar 5) menunjukkan tingkat kesukaan warna flavor udang tertinggi adalah pada penggunaan 1,5% protease biduri dengan waktu hidrolisis 1 jam sebesar 6,48 (sangat merah). Sedangkan tingkat kesukaan warna flavor udang terendah adalah pada penggunaan 2 % protease biduri dengan waktu hidrolisis 0 jam sebesar 2,6 (agak tidak merah).

Pada Gambar 5 menunjukkan tingkat kesukaan warna flavor udang berkisar

padawarna agak tidak merah sampai dengan sangat merah. Hasil analisis ragam menunjukkan terdapat interaksi yang sangat nyata antara konsentrasi protease biduri dengan waktu hidrolisis terhadap warna flavor udang. Konsentrasi protease biduri dan waktu hidrolisis berpengaruh sangat nyata pada perubahan warna flavor udang.

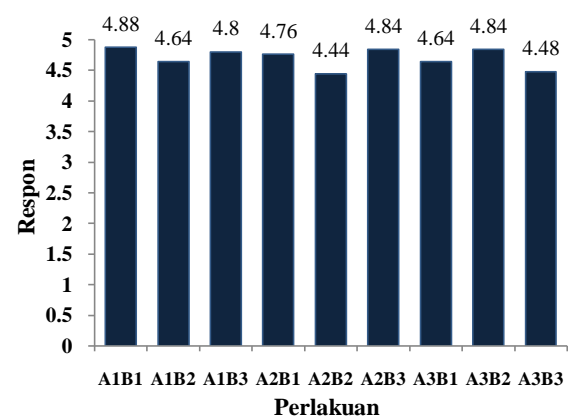
Pada dasarnya warna seluruh hidrolisat protein udang tersebut adalah sama, yaitu warna merah jingga. Perbedaannya hanya terletak pada tingkat kecerahan warna. Warna merah jingga sebenarnya berasal dari pigmen karotenoid yang terkandung dalam udang sendiri. Karotenoid pada udang adalah jenis astaksantin. Sebelumnya dalam udang segar pigmen tersebut tidak nampak, karena terikat dengan protein pada udang itu sendiri. Warna merah jingga tersebut akan timbul apabila terjadi pemutusan ikatan karotenoid-protein pada udang. Peristiwa tersebut terjadi saat udang dipanaskan.

Secara menyeluruh dari data yang diperoleh, menunjukkan bahwa konsentrasi protease yang tinggi dan waktu hidrolisis yang lama menghasilkan flavor udang yang lebih gelap. Sebab pada proses hidrolisis terjadi pemutusan ikatan peptida oleh enzim protease menghasilkan gugus amina sebagai bahan Maillard reaksi yang

selanjutnya dapat bereaksi dengan gugus aldehid dari gula pereduksi dan akhirnya menghasilkan warna coklat (Subagio, dkk., 2002).

d. Uji Kesukaan Flavor Udang

Kesukaan terhadap flavor udang tergantung dari tingkat kesukaan para panelis. Hasil yang diperoleh (Gambar 6) menunjukkan tingkat kesukaan flavor udang tertinggi adalah pada penggunaan 1,5% protease biduri dengan waktu hidrolisis 0 jam sebesar 4,88 (agak suka). Sedangkan tingkat kesukaan flavor udang terendah adalah pada penggunaan 2 % protease biduri dengan waktu hidrolisis 1 jam sebesar 4,44 (netral).



Gambar 6. Histogram uji mutu hedonik untuk tingkat kesukaan flavor udang.

Pada Gambar 6 memperlihatkan bahwa tingkat kesukaan flavor udang hanya berkisar pada netral sampai dengan agak suka. Hasil analisis ragam menunjukkan tidak terdapat interaksi antara konsentrasi protease biduri dengan waktu hidrolisis terhadap kesukaan pada

flavor udang. Konsentrasi protease biduri tidak berpengaruh nyata pada perubahan kesukaan pada flavor udang, begitupula pada waktu hidrolisis. Dengan demikian tidak terdapat perbedaan tingkat kesukaan flavor udang yang berarti pada berbagai konsentrasi protease biduri dan waktu hidrolisis. Karena setiap panelis memiliki tingkat kesukaan terhadap rasa gurih yang berbeda-beda. Tetapi secara menyeluruh rasa flavor yang sangat gurih kurang diminati panelis karena dapat menimbulkan rasa bosan. Rasa yang paling banyak diminati adalah rasa yang agak gurih.

Berdasarkan dari hasil penelitian yang diperoleh, maka kombinasi kadar protease biduri 2,5 % dengan lama hidrolisis 2 jam menghasilkan kadar air dan protein terlarut terbaik, masing-masing 11,08% dan 71,65%. Semakin meningkat konsentrasi protease biduri dan waktu hidrolisis, maka kadar air flavor udang semakin menurun dan kadar protein terlarutnya semakin meningkat. Tingkat kesukaan panelis terhadap warna, aroma dan rasa produk flavor udang terdapat pada kombinasi waktu hidrolisis 1 jam dengan konsentrasi protease 1,5%. Selanjutnya perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang produksi hidrolisat protein udang menggunakan

protease biduri dengan bahan dasar isolat protein udang.

IV. UCAPAN TERIMAKASIH

Kami mengucapkan terimakasih kepada Prof. Dr. H. Mappiratu, MS dan Indriani, S.Si., M.Si.

V. DAFTAR PUSTAKA

- Akhdiya A. 2003. *Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Protease Alkalin Termotabil*. Buletin Plasma Nutfah. 9 (2) : 38-44.
- Ardyanto TD. 2004. *MSG dan Kesehatan : Sejarah, Efek dan Kontroversinya*. Inovasi. 1(16) : 52-56.
- Mappiratu H. 2007. *Pengolahan Hasil Pertanian*. Tadulako University Press: Palu.
- McCabe C, Rolls ET. 2007. *Umami: a delicious flavor formed by convergence of taste and olfactory pathways in the human brain*. European Journal of Neuroscience. 25: 1855–1864.
- Murtini ES, Qomaruddin. 2003. *Pengempukan Daging dengan Enzim Protease Tanaman Biduri (Calotropis gigantean)*. Jurnal Teknol. dan Industri Pangan. 14(3) : 266-268.
- Subagio A, Hartanti S, Windrati WS, Unus, Fauzi M, Herry B. 2002. *Kajian Sifat Fisikokimia dan Organoleptik Hidrolisat Tempe Hasil Hidrolisis Protease*. Jurnal Teknol. dan Industri Pangan. 13(3) : 204-210.
- Witono Y, Aulanni'am, Subagio A, Widjanarko SB. 2007a. *Telaah Teknologi Produksi Protease Secara*

Langsung dari Tanaman Biduri (Calotropis gigantea). Jurnal of Agrotechnologi.1(1) : 8 – 16.

Witono Y, Aulanni'am, Subagio A, Widjanarko SB. 2007b. *Presipitasi dari Getah Biduri (Calotropis gigantean) Secara Salting Out Menggunakan Ammonium Sulphat.* Journal of Agricultura Product Technologi.7(1) : 20 – 26.

Witono Y, Aulanni'am, Subagio A, Widjanarko SB. 2007c. *Purifikasi dan Karakterisasi Parsial Enzim Protease dari Getah Tanaman Biduri (Calotropis gigantean).* Jurnal Teknologi dan Industri Pangan.18(1) : 1 – 9.

Witono Y, Aulanni'am, Subagio A, Widjanarko SB. 2007d. *Karakterisasi Hidrolisat Protein Kedelai Hasil Hidrolisis Menggunakan Protease dari Tanaman Biduri (Calotropis gigantea).* Jurnal Penelitian Hayati. 13 : 7 – 13.

Witono Y. 2008. *Deklorofilasi Ekstrak Protease dari Tanaman Biduri (Calotropis gigantea) dengan Absorban Celite.* Berk. Penel. Hayati. 13 : 115–121.